

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 163–167

Untersuchungen zur vollständigen enzymatischen Hydrolyse von Steroidkonjugaten im Harn

Von V. Graef und M. Fuchs

Zentrum für Biochemie der Universität Gießen

(Eingegangen am 17. Januar/17. März 1975)

Bei der Inkubation von Harn mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* wird nur eine unvollständige Hydrolyse der Steroidkonjugate erreicht, da Harn Stoffe enthält, die diese Enzyme hemmen. Durch die Chromatographie des Harnes an einer Amberlite XAD-2-Säule ist eine Trennung der Hemmstoffe von den Steroidkonjugaten möglich. Mit dieser Methode läßt sich die vollständige enzymatische Hydrolyse der Steroidkonjugate im Harn in 24 h bei 37 °C oder in 2 h bei 55 °C durchführen.

Studies on the complete enzymatic hydrolysis of steroid conjugates in urine

The incubation of urine with β -glucuronidase/arylsulphatase from *Helix pomatia* results in the incomplete hydrolysis of urinary steroid conjugates, because inhibitors of these enzymes are present in urine. The inhibitors can be separated from the steroid conjugates by chromatography of the urine on a column of Amberlite XAD-2. By this method a complete enzymatic hydrolysis of urinary steroid conjugates is possible in 24 hours at 37 °C or in 2 hours at 55 °C.

Die Metaboliten der Steroidhormone liegen im Harn in Form von Glucuroniden und Sulfaten vor, die vor der eigentlichen Bestimmung gespalten werden müssen. Das gelingt am schonendsten durch enzymatische Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus Rinderleber, aus Bakterien oder aus *Helix pomatia*. Die letztgenannte Präparation enthält außer β -Glucuronidase auch Sulfatasen, die auch Sulfate von 3β -Hydroxysteroiden (z. B. Dehydroepiandrosteron) und Östrogenen spalten.

Man nimmt im allgemeinen an, daß bei der Inkubation des Harnes mit β -Glucuronidase die Steroidglucuronide vollständig gespalten werden. Dabei wird häufig der Umstand übersehen, daß Harn zahlreiche Hemmstoffe für die β -Glucuronidase (1–4) und für die Sulfatase (5, 6) enthält, die eine vollständige Spaltung der Steroidkonjugate verhindern können. In der vorliegenden Arbeit haben wir die Bedingungen für eine vollständige Hydrolyse der Steroidkonjugate im Harn untersucht. Drei Methoden wurden miteinander verglichen:

1. Inkubation von Nativharn mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*,
2. Abtrennung der Steroidkonjugate durch Chromatographie des Harnes an einer Säule aus Amberlite XAD-2 nach Bradlow (7) und anschließende Hydrolyse mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase und
3. Extraktion der Steroidkonjugate aus dem Harn mit Äther/Äthanol nach Kellie & Wade (8) und anschließende enzymatische Hydrolyse.

Material und Methoden

Reagenzien

β -Glucuronidase/Arylsulfatase (5,2 U = 100 000 *Fishman*-Einheiten β -Glucuronidase/ml und 2,6 U = 57 000 *Roy*-Einheiten Arylsulfatase/ml): Fa. BOEHRINGER, Mannheim; Chromosorb W/AW-DMCS, 80–100 mesh, für Gaschromatographie; Östriol, Androsteron, Ätiocholanolon, 5β -Androstan-3, 17-dion, Dehydroepiandrosteron (DHA), Dehydroepiandrosteronsulfat-Natriumsalz, Pregnantriol, Pregnandiol: Fa. E. MERCK, Darmstadt; Silicon XE-60, pract. für Gaschromatographie; Silicon SE-30, pract., für Gaschromatographie; N, O-Bis-(trimethylsilyl)acetamid, reinst; Trimethylchlorosilan, reinst; Amberlite XAD-2 (300–1000 μ m) p.a.: Fa. SERVA, Heidelberg. Diäthyläther p. a. (Fa. E. MERCK, Darmstadt) wurde über Natriumdraht destilliert und in braunen Flaschen aufbewahrt. Alle übrigen Chemikalien stammen von der Firma E. MERCK, Darmstadt.

Geräte

Gaschromatograph F 20 der Fa. PERKIN-ELMER mit Flammenionisationsdetektor, Glassäule von 2 m Länge mit 3 % XE-60 auf Chromosorb W/AW-DMCS, Stickstoffstrom 46 ml/min, synthetische Luft 300 ml/min, Wasserstoff 30 ml/min, Säulentemperatur 210–230 °C, Einspritzblock 255–290 °C. Gaschromatograph 1525-C der Firma VARIAN mit Flammenionisationsdetektor, Glassäule von 2 m Länge mit 3 % SE-30 auf Chromosorb W/AW-DMCS, Stickstoffstrom 40 ml/min, synthetische Luft 300 ml/min, Wasserstoff 30 ml/min, Säulentemperatur 260–270 °C, Einspritzblock 300 °C. Dieses Gerät wurde zur Östriol-Bestimmung verwendet. Kompensations-Polarplanimeter zur Bestimmung der Peakflächen: Fa. A. OTT, Kempten.

Normalmethode zur enzymatischen Hydrolyse von Steroidkonjugaten

10 ml Harn wurden mit Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt, mit 1 ml 2 mol/l Acetatpuffer, pH 5,2, und 100 μ l β -Glucuronidase/

Arylsulfatase versetzt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Harn wurde nach dem Erkalten einmal mit 40 ml und einmal mit 20 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden einmal mit 10 ml 1 mol/l NaOH und zweimal mit je 10 ml Wasser ausgeschüttelt und am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40 °C eingedampft. Reste von Wasser wurden mit 5 ml Äthanol im Vakuum abgedampft. Den Verdampfungsrückstand überführten wir mit zweimal 2 ml Methanol in ein spitzes Zentrifugenröhrchen und verdampften das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 50 °C. In diesem Röhrchen wurden dann 100 bzw. 200 µl 5 β -Androstan-3,17-dion-Lösung (1 g/l Äthanol) verdampft. Dann ließen wir 1 ml Äthanol/Benzol (Volumina, 2 ml + 7 ml) an der Innenwand des Röhrchens herunterlaufen, um die Steroide in die Spitze zu bringen. Das Lösungsmittel wurde ebenfalls mit trockenem Stickstoff bei 50 °C abgeblasen und der Rückstand in 50 µl Schwefelkohlenstoff aufgenommen. 1 µl der Lösung wurde in den Gaschromatographen eingespritzt.

Extraktion der Steroidkonjugate aus dem Harn nach Kellie und Wade (8)

10 ml Harn, in dem 5 g Ammoniumsulfat gelöst waren, wurden dreimal mit je 10 ml Äther/Äthanol (Volumina, 30 ml + 10 ml) ausgeschüttelt. Zur Trennung der Phasen war eine Zentrifugation bei 4500 U/min nötig. Die vereinigten organischen Extrakte wurden durch ein mit Äther/Äthanol angefeuchtetes Faltenfilter in einen 100 ml-Rundkolben filtriert. Das Filter wurde mit Äther/Äthanol nachgespült. Nach Verdampfen des Lösungsmittels am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40 °C wurde der Rückstand in 10 ml dest. Wasser und 1 ml 2 mol/l Acetatpuffer, pH 5,2, gelöst und mit 100 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase 24 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Normalmethode.

Amberlite-Säulenmethode zur Extraktion von Steroidkonjugaten aus dem Harn

100 g Amberlite XAD-2 wurden zur Entfernung niedermolekularer Bestandteile dreimal mit je 500 ml Methanol p. a. 2 min geschüttelt. Das überstehende Methanol wurde nach 5 min abgegossen. Anschließend wurde das Amberlite-Harz dreimal mit je 500 ml dest. Wasser je 2 min durchgeschüttelt und in wässriger Suspension aufbewahrt. Benutztes Amberlite kann durch Schütteln mit Methanol und Wasser in der gleichen Weise regeneriert werden. In eine Glassäule (48 x 1 cm) mit Hahn, die unten mit feuchter Watte verschlossen war, wurde soviel Amberlite gefüllt, daß die Füllhöhe 8 cm betrug.

Auf die Amberlite-Säule wurden 10 ml Harn pipettiert. Nach dem Einsickern des Harnes wurde mit 10 ml dest. Wasser nachgewaschen, Harn und Waschwasser wurden verworfen. Die an das Amberlite-Harz adsorbierten Steroide, Steroidglucuronide und Steroidsulfate wurden mit 20 ml Methanol eluiert. Das Eluat dampften wir im Rundkolben am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in 10 ml dest. Wasser und 1 ml 2 mol/l Acetatpuffer, pH 5,2, gelöst und mit 100 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase 24 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Normalmethode.

Östriol-Bestimmung im Harn schwangerer Frauen

10 ml Harn wurden, wie oben beschrieben, an einer Amberlite-Säule gereinigt. Die Waschwassermenge betrug hierbei nur 5 ml. Die im Methanol-Eluat enthaltenen Steroidkonjugate wurden nach Verdampfen des Methanols in 10 ml Wasser und 1 ml 2 mol/l Acetatpuffer, pH 5,2, mit 100 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase 24 h bei 37 °C hydrolysiert. Das erkaltete Hydrolysat wurde mit 2,5 ml 10 mol/l NaOH versetzt und in einen Schütteltrichter überführt. Der Kolben wurde mit 3 ml dest. Wasser nachgespült. Die alkalische Lösung wurde zur Entfernung neutraler Steroide mit 30 ml Äther ausgeschüttelt und in einen zweiten Schütteltrichter überführt. Der Äther wurde mit 3 ml 1 mol/l NaOH nachextrahiert und dann verworfen. Die vereinigten alkalischen Lösungen säuerten wir mit 3 ml konz. Salzsäure an und extrahierten sie zweimal mit je 30 ml eiskaltem Äther. Die vereinigten Äther-Extrakte wurden einmal mit 5 ml Carbonatpuffer, pH 10,0, und zweimal mit je 5 ml dest. Wasser

ausgeschüttelt und eingedampft. Reste von Wasser wurden durch Abdampfen mit 5 ml Äthanol im Vakuum entfernt. Den Verdampfungsrückstand überführte man mit zweimal 2 ml Methanol in ein Spitzröhrchen, in dem die Lösung im Stickstoffstrom bei 50 °C zur Trockne gedampft wurde. Der Rückstand wurde mit 0,2 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid 1 h auf 65 °C erwärmt, worauf das Acetylierungsgemisch im Stickstoffstrom bei 50 °C abgeblasen wurde. Nach Zusatz von 200 µl internem Standard (1 g/l Cholesterinacetat in Aceton) wurde erneut mit Stickstoff eingedampft. Wir nahmen den Rückstand in 100 µl Aceton auf und spritzten 1 µl dieser Lösung in den Gaschromatographen ein.

Dünnschichtchromatographische Vorreinigung des Harnextraktes

Zur Abtrennung von Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydroepiandrosteron wurde der nach Amberlite-Extraktion und enzymatischer Hydrolyse gewonnene Harnextrakt mit zweimal 100 µl Aceton punktförmig 1,5 cm vom unteren Rand einer Kieselgel G-Dünnschichtplatte aufgetragen. Daneben trugen wir je 10–15 µg der reinen Steroide auf. Nach Entwickeln der Platte im Laufmittel Chloroform/Äthanol (Volumina 95 ml + 5 ml) wurden die Flecken der Referenzsubstanzen mit einer Mischung aus 2 Vol 20 g/l alkohol. *m*-Dinitrobenzol-Lösung und 1 Vol methanol. KOH (7,5 g in 50 ml Methanol) angesprüht und mit einem Föhn erwärmt. Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydroepiandrosteron des Harnextraktes wurden zusammen ausgekratzt, das Kieselgel wurde dreimal mit je 2 ml Methanol eluiert.

Zur Isolierung von Pregnan-20-ol aus dem Harnextrakt verwendeten wir Kieselgel G-Platten, die im Laufmittel Chloroform/Äthanol (Volumina 90 ml + 10 ml) entwickelt wurden. Der Vergleichsfleck des neben dem Harnextrakt aufgetragenen reinen Pregnan-20-ols wurde sichtbar gemacht, indem die Platte kurz in eine Kammer mit Joddampf gestellt wurde. Pregnan-20-ol wurde aus dem Harnextrakt auf Kieselgel G-Dünnschichtplatten abgetrennt, die in Chloroform/Aceton (Volumina 50 ml + 50 ml) entwickelt wurden. Die Steroide wurden mit dreimal 2 ml Methanol aus dem ausgekratzen Kieselgel eluiert.

Ergebnisse

Überprüfung der Adsorptionsfähigkeit des Amberlite-Harzes für Steroidkonjugate

Um das Adsorptionsvermögen des Amberlite XAD-2 für Steroidsulfate zu prüfen, gaben wir je 8 mg Östronsulfat bzw. Dehydroepiandrosteronsulfat-Natrium in je 16 ml Wasser auf die Amberlite-Säule, die anschließend mit je 10 ml Wasser nachgewaschen wurde. In den wässrigen Eluat fanden wir nach Inkubation mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase keine Steroide. Die eingesetzten Steroidsulfate ließen sich vollständig mit 20 ml Methanol von der Säule eluieren.

Um zu prüfen, ob auch Steroidglucuronide fest an das Amberlite-Harz adsorbiert werden und ob sie sich durch Wasser eluieren lassen, gaben wir 10 ml Harn auf eine Amberlite-Säule, die mit 10 ml Wasser nachgewaschen wurde. Harn und Waschwasser wurden mit Ammoniumsulfat gesättigt und mit Äther/Äthanol extrahiert. In diesem Extrakt konnten wir nach enzymatischer Hydrolyse keine Steroide nachweisen. Durch Elution der Amberlite-Säule mit 20 ml Methanol wurden alle Steroidkonjugate heruntergelöst.

Während die Konjugate von Androsteron, Ätiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Pregnan-20-ol und Pregnan-

triol fest an Amberlite gebunden wurden und sich durch Waschen mit Wasser nicht eluieren ließen, wurden die Konjugate des Östriols weniger fest an das Amberlite gebunden. Wir analysierten 2 Harn von schwangeren Frauen, die 310 bzw. 207 µg Östriol/10 ml enthielten, mit der Amberlite-Methode. Durch Nachwaschen der Säule mit 5 ml Wasser wurden 1,6 % und durch Waschen mit 20 ml Wasser 7,6 % konjugiertes Östriol von der Säule eluiert.

Vergleich der Normalmethode mit der Äther/Äthanol-Extraktionsmethode und der Amberlite-Methode

Wir haben 10 Harn nach der Normalmethode (Inkubation von Nativharn mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase), nach der Amberlite-Methode und nach der Äther/Äthanol-Extraktionsmethode analysiert. Bei den beiden letztgenannten Methoden wurden die Hemmstoffe für β -Glucuronidase und Sulfatase abgetrennt, was zu einer besseren Spaltung der Steroidkonjugate führte (Tab. 1). Die höchsten Steroidkonzentrationen ermittelten wir mit der Amberlite-Methode. Die nach der Äther/Äthanol-Extraktionsmethode gefundenen Steroidkonzentrationen lagen in allen Fällen unter den mit der Amberlite-Methode gefundenen Werten. Aus den Angaben in

Tab. 1. Vergleich der Steroidbestimmungen in 10 Harnen mit der Normalmethode, der Äther/Äthanol-Extraktionsmethode und der Amberlite-Methode (= 100%).

Steroid	Steroide gefunden im Vergleich zur	
	Normalmethode (%)	Äther/Äthanol-Methode (%)
Androsteron	71,2 ± 14,2	86,9 ± 6,0
Ätiocholanolon	74,0 ± 17,3	87,3 ± 10,9
Dehydroepiandrosteron	21,2 ± 7,5	61,3 ± 23,6
Pregnandiol	63,8 ± 18,0	88,2 ± 9,9
Pregnantriol	72,0 ± 17,0	82,8 ± 13,1

Tabelle 1 ist zu ersehen, daß die Spaltung der Steroidkonjugate nach der Normalmethode unvollständig ist. Besonders schlecht wurde Dehydroepiandrosteron-Sulfat gespalten, da im Harn enthaltene Phosphat- und Sulfationen die Sulfatase stark hemmen.

Um zu prüfen, ob mit der dreifachen Enzymmenge (300 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase/10 ml Harn) eine vollständige Hydrolyse der Steroidkonjugate in Nativharn möglich ist, haben wir 5 Harn mit 100 bzw. 300 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase nach der Normalmethode und nach der Amberlite-Methode (mit 100 µl Enzym) analysiert. Tabelle 2 zeigt, daß sich die enzymatische Hydrolyse in vielen Fällen zwar verbessern läßt,

Tab. 2. Vergleich der Normalmethode (unterschiedliche Mengen β -Glucuronidase/Arylsulfatase) mit der Amberlite-Methode.

Steroide gefunden (mg/l Harn)						
Harn	Steroid	Amberlite-	Normalmethode			
		Methode mit 100 µl Enzym (A) (mg/l)	mit 100 µl Enzym (mg/l)	(% von A)	mit 300 µl Enzym (mg/l)	(% von A)
I	Androsteron	4,70	4,71	100,2	3,92	83,4
	Ätiocholanolon	3,60	3,56	98,8	2,88	80,0
	Dehydroepiandrosteron	2,30	0,52	22,6	1,19	51,7
	Pregnandiol	1,00	0,62	62,0	0,66	66,0
	Pregnantriol	0,72	0,62	86,1	0,45	62,5
II	Androsteron	6,17	4,33	70,1	4,90	79,4
	Ätiocholanolon	2,33	1,79	76,8	1,94	83,2
	Dehydroepiandrosteron	1,30	0,26	20,0	0,45	34,6
	Pregnandiol	1,01	0,53	52,4	0,65	64,3
	Pregnantriol	0,78	0,40	51,2	0,39	50,0
III	Androsteron	3,72	2,67	71,7	3,03	81,4
	Ätiocholanolon	1,82	1,22	67,0	1,48	81,3
	Dehydroepiandrosteron	3,76	1,57	41,7	2,56	68,0
	Pregnandiol	0,99	0,63	63,6	0,79	79,7
	Pregnantriol	0,95	0,64	97,3	0,83	87,3
IV	Androsteron	7,06	4,57	64,7	5,12	72,5
	Ätiocholanolon	2,22	1,52	68,4	1,54	69,3
	Dehydroepiandrosteron	4,32	1,53	35,4	2,55	59,0
	Pregnandiol	1,48	0,47	31,7	0,72	48,6
	Pregnantriol	1,18	0,51	43,2	0,43	36,4
V	Androsteron	4,45	2,66	59,7	2,70	60,6
	Ätiocholanolon	3,45	2,24	64,9	2,34	67,8
	Dehydroepiandrosteron	5,20	1,49	28,6	2,64	50,7
	Pregnandiol	1,23	0,41	33,3	0,57	46,3
	Pregnantriol	0,78	0,24	30,7	0,28	35,8

wenn die Harne mit der dreifachen Enzymmenge inkubiert wurden, doch lagen die Werte immer noch deutlich unter den mit der Amberlite-Methode gewonnenen Werten. In einigen Fällen führte eine Vergrößerung der Enzymmenge bei der Normalmethode auch zu einer Verschlechterung der Hydrolyse. Das wurde bereits von Kornel (9) bei der Hydrolyse von Corticosteroid-glucuroniden mit β -Glucuronidase aus Rinderleber beobachtet.

Inkubationsdauer

Da durch die Vorreinigung des Harnes an Amberlite die Hemmstoffe der β -Glucuronidase und der Sulfatase entfernt wurden, erschien es möglich, die Steroidkonjugate auch in kürzeren Zeiten zu spalten. Zwei Harne wurden mit der Amberlite-Methode 6, 12, 18 und 24 h bei 37 °C mit je 100 μ l β -Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert. Wir fanden, daß zur vollständigen Hydrolyse von Androsteron-, Ätiocholanolon- und Pregnandiolglucuronid und von Dehydroepiandrosteron-Sulfat eine Inkubationszeit von 24 h nötig ist.

Um die Hydrolysedauer der nach Abtrennung der Hemmstoffe aus Harn mit Amberlite extrahierten Steroidkonjugate zu verkürzen, haben wir die enzymatische Hydrolyse bei erhöhter Temperatur durchgeführt. Wir fanden, daß das Temperaturoptimum für die β -Glucuronidase (mit Phenolphthalein-glucuronid als Substrat) bei 55 °C und für die Arylsulfatase (mit Phenolphthalein-disulfat als Substrat) bei 45 °C liegt. Da aber Steroidglucuronide und -sulfate gleichzeitig gespalten werden sollten, war zu prüfen, ob Dehydroepiandrosteron-sulfat sich auch bei 55 °C in 2 h vollständig spalten läßt. Wir fanden, daß 25–150 μ g Dehydroepiandrosteron-sulfat mit 100 μ l β -Glucuronidase/Arylsulfatase in 2 h bei 55 °C zu durchschnittlich 98,5% hydrolysiert wurden.

Eine Schnellhydrolyse ist besonders für die Östriol-Bestimmung im Harn schwangerer Frauen erforderlich. Wir haben 9 Harne (je 10 ml) nach Entfernung der Hemmstoffe durch Amberlite-Chromatographie mit 200 μ l β -Glucuronidase/Arylsulfatase 2 und 6 h bei 55 °C und 24 h bei 37 °C inkubiert. Verglichen mit

Tab. 3. Östriol-Bestimmung im Harn schwangerer Frauen nach der Amberlite-Methode. Vergleich der enzymatischen Hydrolyse bei 55 °C und bei 37 °C.

Östriol (mg/l Harn) gefunden nach einer Inkubationszeit von			
Harn	2 h (55 °C)	6 h (55 °C)	24 h (37 °C)
I	13,4	13,1	12,8
II	22,1	22,6	22,9
III	23,7	22,9	22,5
IV	13,3	13,8	13,6
V	22,0	22,1	22,6
VI	10,0	9,6	9,6
VII	33,5	—	33,8
VIII	34,8	—	35,6
IX	24,6	24,6	25,0

der 24 h Hydrolyse bei 37 °C fanden wir nach 2 h bei 55 °C 100,1 \pm 3,5% und nach 6 h bei 55 °C 100,0 \pm 1,8% Östriol (Tab. 3).

Präzision und Richtigkeit der Amberlite-Methode

Zur Prüfung der Präzision der Methode wurden je 10 ml desselben 24 h-Harnes einer männlichen Versuchsperson zwölfmal analysiert. Zur Prüfung der Präzision der Östriol-Bestimmung wurden je 10 ml Harn einer schwangeren Frau sechsmal analysiert. Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für alle Steroide sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 4. Präzision der gaschromatographischen Steroidbestimmung im Harn nach der Amberlite-Methode

Steroid	n	\bar{x} (mg/l)	s (mg/l)	VK (%)
Androsteron	12	3,10	0,160	5,2
Ätiocholanolon	12	1,66	0,106	6,4
Dehydroepiandrosteron	12	5,72	0,280	4,9
Pregnandiol	12	1,22	0,096	7,9
Pregnantriol	12	0,93	0,085	9,1
Östriol	6	12,90	0,527	4,0

In der Regel enthalten die Gaschromatogramme der Harnextrakte keine weiteren Peaks von Substanzen, die ähnliche Retentionszeiten besitzen wie Androsteron, Ätiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Pregnandiol und Pregnantriol, so daß sich eine weitere Vorreinigung der Harnextrakte erübrigt. In einzelnen Fällen enthielten die Gaschromatogramme aber noch zusätzliche Peaks in der Nähe der Peaks der genannten Steroide, so daß es z. B. zur Schulterbildung kam. In diesen Fällen haben wir die Harnextrakte durch Dünnschichtchromatographie vorgereinigt.

Wir haben die Wiederfindungsraten für die einzelnen Schritte untersucht. Die Wiederfindung nach Amberlite-Säulenchromatographie betrug für Androsteron 99,6%, für Pregnantriol 99,0% und für Tetrahydrocortisol 99,7%. Der Verlust dürfte auch bei anderen C₁₉- und C₂₁-Steroiden nicht höher als 1% sein. Beim Östriol-glucuronid beträgt er 1,6%, wenn die Amberlite-Säule

Tab. 5. Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Äther-Extraktion und nach Dünnschichtchromatographie

Steroid	n	Wiederfindung nach Extraktion (%)	Wiederfindung nach Dünnschichtchromatographie (%)
Androsteron	6	98,4 \pm 2,4	93,1 \pm 1,9
Ätiocholanolon	6	97,9 \pm 2,3	95,7 \pm 2,2
Dehydroepiandrosteron	6	94,7 \pm 1,3	93,4 \pm 2,0
Pregnandiol	6	98,9 \pm 1,7	100,9 \pm 1,0
Pregnantriol	6	97,2 \pm 4,8	99,0 \pm 2,9

mit 5 ml Wasser gewaschen wird. Die Wiederfindung nach Extraktion der Steroide mit Äther (je 50 µg Steroid/10 ml Wasser) und Überführen des Extraktes in Spitzröhrchen wurde zusammen bestimmt (Tab. 5). Die Wiederfindung für die gesamte Östriol-Bestimmungsmethode mit Vorreinigung des Harnes an einer Amberlite-Säule betrug 85,0%.

Diskussion

Die im Harn enthaltenen Steroidkonjugate lassen sich zwar durch β -Glucuronidase und Sulfatase am schonendsten hydrolysieren, doch ist damit zu rechnen, daß infolge der Anwesenheit von Hemmstoffen für diese Enzyme im Harn die Hydrolyse nicht vollständig ist. Um das Ausmaß dieser Hemmung zu untersuchen, haben wir die enzymatische Hydrolyse nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt.

1. Nativharn wurde mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert (Normalmethode).
2. Die gleichen Harne wurden nach einer erstmals von Bradlow (7) beschriebenen Methode mit Amberlite XAD-2, einem neutralen Polystyrolharz, behandelt. Dabei wurden die Steroidkonjugate an Amberlite adsorbiert und konnten so von den Hemmstoffen getrennt werden. Die Steroidkonjugate wurden mit Methanol vom Amberlite eluiert und anschließend enzymatisch mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase hydrolysiert.
3. Die Steroidkonjugate wurden aus dem mit Ammoniumsulfat gesättigten Harn mit Äther/Äthanol nach

Kellie & Wade (8) extrahiert und auf diese Weise von den gut wasserlöslichen Hemmstoffen getrennt.

Die Steroidkonjugate wurden dann enzymatisch gespalten.

Beim Vergleich der 3 Methoden wurde deutlich, daß bei der Inkubation von Nativharn mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase nur eine unvollständige Spaltung der Steroidkonjugate erreicht wurde. Auch mit der dreifachen Enzymmenge wurde keine vollständige Hydrolyse erreicht. Außerdem ist die Hydrolyse mit zu großen Enzymmengen oder auch eine Verlängerung der Hydrolysedauer nicht zu empfehlen, da die meisten Präparationen der β -Glucuronidase noch Fremdaktivitäten enthalten, die Steroide chemisch verändern können (2, 10, 11). Durch die Amberlite-Methode wurde eine vollständige Trennung der Steroidkonjugate von den Hemmstoffen erreicht. Die Steroidkonjugate ließen sich mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase vollständig spalten. Diese Methode läßt sich am schnellsten und einfachsten durchführen und liefert die höchsten Ausbeuten an Steroiden. Zur vollständigen Hydrolyse bei 37 °C ist eine Inkubationsdauer von 24 h erforderlich. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 55 °C lassen sich die Steroidkonjugate bereits in 2 h vollständig spalten. Diese Schnellhydrolyse ist von besonderer Bedeutung für die Östriol-Bestimmung im Harn schwangerer Frauen. Die in der verwendeten Enzympräparation aus *Helix pomatia* enthaltene Sulfatase spaltet nur die Sulfate von 3β -Hydroxysteroiden und Östrogenen, nicht jedoch 3α -Hydroxysteroidsulfate. Um auch diese meist nur in geringer Menge im Harn enthaltenen Sulfate zu spalten, muß sich der enzymatischen Hydrolyse noch die Solvolyse anschließen.

Literatur

1. Karunairatnam, M. C. & Levvy, G. A. (1949), *Biochem. J.* 44, 599–604.
2. Slaunwhite Jr., W. R. & Sandberg, A. V. (1960), *Endocrinology* 67, 815–828.
3. Dohrmann, R. E. (1969), β -Glucuronidase, Springer-Verlag Berlin–Heidelberg–New York.
4. Sakamoto, W. & Nisihikaze, O. (1972), *Enzyme* 13, 211–223.
5. Roy, A. B. (1956), *Biochem. J.* 62, 41–49.
6. Roy, A. B. (1957), *Biochem. J.* 66, 700–703.
7. Bradlow, H. L. (1968), *Steroids* 11, 265–272.
8. Kellie, A. E. & Wade, A. P. (1957), *Biochem. J.* 66, 196–206.
9. Kornel, L. (1960), *Metabolism* 9, 82–84.
10. Vestergaard, P. (1962), *Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl.* 64, 50–68.
11. Roy, S. & Slaunwhite Jr., W. R. (1970), *Steroids* 16, 69–78.

Dr. V. Graef
Zentrum f. Biochemie
am Klinikum d.
Justus Liebig-Univ.
63 Gießen
Friedrichstr. 24

